

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"

*Facoltà di Medicina e Chirurgia*

Dipartimento di Scienze Biomorfologiche e funzionali

Direttore Prof. Marco Salvatore

**Dottorato di Ricerca in “Imaging Molecolare”**

**Tesi Sperimentale**

*Analisi molecolare mediante Risonanza Magnetica Nucleare dei tessuti renali, epatici, splenici e cardiaci in pazienti affetti da Emoglobinuria Parossistica Notturna: valore aggiunto della metodica nel follow-up dei pazienti trattati con un inibitore dell'emolisi complemento-mediata (Eculizumab).*

***Coordinatore Prof. Marco Salvatore***

Tutor

**Dott. Massimo Imbriaco**

Dottorando

**Dott. Alessandro Cangiano**

# INDICE

**ABSTRACT**

**INTRODUZIONE** \_\_\_\_\_

**MATERIALI E METODI** \_\_\_\_\_

*Popolazione dei pazienti* \_\_\_\_\_

*Tecnica di risonanza magnetica* \_\_\_\_\_

*Analisi statistica* \_\_\_\_\_

**RISULTATI** \_\_\_\_\_

**DISCUSSIONE** \_\_\_\_\_

**LIMITI** \_\_\_\_\_

**CONCLUSIONI** \_\_\_\_\_

**BIBLIOGRAFIA** \_\_\_\_\_

# ABSTRACT

## **OBIETTIVI:**

L'EPN è una patologia nota per portare ad una carenza di ferro, a causa della perdita urinaria del ferro, secondaria a emolisi intravascolare. Il farmaco Eculizumab è efficace nel controllo dell'emolisi intravascolare, ma i suoi effetti a lungo termine sull'omeostasi del ferro non sono stati ancora chiariti. La Risonanza Magnetica (RM) è un' esame fondamentale e "non invasivo" per valutare la distribuzione e l'accumulo di ferro. Lo scopo di questo studio è stato di valutare la compartimentalizzazione del ferro nei pazienti affetti da EPN, alla ricerca di cambiamenti che si verificano durante il trattamento con Eculizumab; in particolare, sono stati utilizzati marcatori di emolisi intravascolare combinati con la RM per valutare il contenuto di ferro calcolato nel rene, fegato, milza e cuore e verificato quindi il valore aggiunto che la RM può avere nella diagnosi e nel follow-up dei pazienti affetti da EPN in trattamento farmacologico con Eculizumab.

**MATERIALI E METODI:** Abbiamo studiato la distribuzione di ferro attraverso un protocollo di Risonanza Magnetica che ha permesso di analizzare i cambiamenti che si verificano a livello molecolare nei vari organi (fegato, rene, milza e cuore) in 17 pazienti affetti da EPN e divisi in diverse epoche: pazienti pre-trattamento (gruppo A), pazienti post-trattamento al tempo 1 (gruppo B, mesi 21) e al tempo 2 (gruppo C, mesi 74, con follow-up più lungo).

**RISULTATI:** I risultati del nostro lavoro hanno mostrato che i pazienti liberi da Eculizumab mostravano emolisi intravascolare con livelli di ferritina sierica normali/bassi, e presentavano un modello omogeneo di distribuzione del ferro con siderosi della corteccia renale e assenza di deposito di ferro epato-splenico, come rilevato dalla RM. I pazienti trattati con Eculizumab, invece, (follow-up medio di 50 mesi) hanno la tendenza a normalizzare il grado di siderosi renale, con l'eccezione di coloro che subiscono residua emolisi intravascolare. La maggior parte dei pazienti hanno aumentato il loro contenuto di ferro nel fegato e nella milza. Un moderato o

grave sovraccarico di ferro, è di solito associato con le trasfusioni di sangue, o con anemia residua dovuta a emolisi extravascolare. Nella maggior parte dei casi il sovraccarico di ferro era considerato subclinico e la chelazione del ferro non è stata necessaria. Questo approccio conservativo è stato supportato dalla rivalutazione a lungo termine, che ha dimostrato che il contenuto di ferro può leggermente aumentare nel tempo nel fegato senza alcuna conseguenza clinica, e in ogni caso non ha influenzato il cuore. Abbiamo infine dimostrato che l'omeostasi del ferro subisce cambiamenti drammatici mediante l'azione efficace del trattamento anticomplemento. Infatti, con eculizumab, l'inibizione di emolisi intravascolare previene la carenza di ferro tipica della EPN. Inoltre, molti pazienti diventano inclini a sviluppare un sovraccarico di ferro. Se questo sovraccarico richiede una regolare chelazione del ferro è ancora poco chiaro, ma suggerisce che l'omeostasi del ferro deve essere valutata in tutti i pazienti affetti da EPN trattati con eculizumab.

**CONCLUSIONI:** I risultati del nostro studio, dimostrano il valore aggiunto che ha la RM, in modo del tutto invasivo, nella rilevazione del sovraccarico di ferro a carico del fegato, milza, rene e cuore nei pazienti affetti da EPN ed in corso di trattamento con Eculizumab .

## Introduzione

Negli ultimi anni abbiamo imparato molto sul metabolismo del ferro, come è regolato a livello cellulare e molecolare, ed in particolare con le tecniche di imaging, tra cui la RM, può essere identificato e studiato in vivo; quest'ultima infatti, grazie anche alle più recenti innovazioni tecnologiche sia in ambito hardware che software, permette la realizzazione di esami che oltre a fornire dei fini dettagli anatomici e funzionali, rende possibile una reale caratterizzazione "in vivo" dei processi patologici delle patologie di accumulo del ferro, ovvero dell'emocromatosi (1).

L'emocromatosi è una malattia ereditaria causata da difetti nei meccanismi di regolazione del metabolismo del ferro che conducono al progressivo accumulo di ferro nell'organismo e, nel suo stadio più avanzato, allo sviluppo di gravi danni d'organo (2). Viene classificata in una forma primitiva (EP) e una forma secondaria (ES). L'EP ha un'ereditarietà autosomica recessiva e nella maggior parte dei casi, la mutazione genetica del cromosoma X è strettamente associata al locus genico del complesso maggiore di istocompatibilità (3). La fisiopatologia di questa malattia vede il ferro depositarsi negli epatociti e in altre cellule parenchimali (pancreas, cuore), provocando fenomeni di danno e tossicità cellulare attraverso l'instaurarsi di modifiche irreversibili tra cui la fibrosi (4). L'epatomegalia è presente nel 90% dei pazienti, il diabete mellito nel 50%. Il picco di incidenza è nella quarta e quinta decade di vita, con una prevalenza di 10:1 nei maschi. Nello stadio precoce, la deposizione di ferro è limitata al fegato mentre il pancreas ed il cuore sono soventemente risparmiati così come la milza in quanto non è presente disfunzione delle cellule reticolo-endoteliali. Nella malattia avanzata, anche il pancreas e cuore mostrano accumulo di ferro (5). La forma primaria può essere complicata dalla fibrosi peri-portale, progredire in cirrosi epatica e portare dunque ad un aumentato rischio di HCC (6).

L'emosiderosi o emocromatosi secondaria (trasfusionale) è determinata da un aumentato apporto di ferro dovuto a multiple trasfusioni (anemia cronica), o

eccessiva terapia marziale o un aumentato assorbimento di ferro (patologia epatica alcolica). Questa forma secondaria prevede la deposizione nelle cellule di Kupffer e coinvolge anche la milza e il midollo osseo (caratteristica distintiva dalle forme primarie) (4, 6, 7).

Tutte le volte che si sospetta un sovraccarico di ferro e in caso di iperferritinemia, è utile quindi quantificare il deposito di ferro. A questo scopo, possono essere utilizzate parametri ematochimici e varie tecniche strumentali (8) in base alle caratteristiche del paziente, alla sede e all'entità del sovraccarico sospettato. Tra i parametri standards ematochimici ricordiamo la ferritina e la sideremia, che sono i più rappresentativi dell'assetto del ferro; ovviamente il rapporto tra livello di ferritina e lo stato di ferro, in alcuni casi, può essere inficiato da stati infiammatori o dall'intensità della terapia trasfusionale (9). Tra le tecniche strumentali, in caso si ipotizzi un sovraccarico di ferro nel fegato di entità tale da aver già determinato un danno epatico irreversibile è utile un accertamento diretto tramite biopsia per valutare la fibrosi. Purtroppo, la biopsia epatica è invasiva, dolorosa, costosa, e ha un'alta variabilità di campionamento (10, 11) in quanto un piccolo frustolo non sempre è rappresentativo dell'intero coinvolgimento epatico (12).

Quando la fase di malattia è iniziale e non si sospetta la presenza di un danno d'organo la quantificazione di ferro nei tessuti può essere effettuata con tecniche di imaging non invasive come la Tomografia Computerizzata (TC) e la Risonanza Magnetica (RM). La Tomografia Computerizzata Quantitativa (QCT), nello specifico, è stata proposta come un strumento non invasivo 30 anni fa', per stimare e monitorare, la concentrazione di ferro epatico (LIC) (13, 14), attraverso la misura dei coefficienti attenuazione, ma non c'è ad oggi un'assoluta validazione in campo scientifico: il limite principale della TC, infatti, è la scarsa sensibilità alle basse concentrazioni di ferro, in particolare per valori di  $LIC < 22 \text{ mg/g}$ , corrispondenti ad un attenuazione soglia per QCT ( $> 76 \text{ HU}$ ); valori TC  $> 76 \text{ HU}$  sono quindi significativi per accumulo (15, 16, 17).

Dai dati della letteratura, quindi, la RM, per la sua elevata sensibilità, sta sempre più sostituendo la TC, suggerendo un ruolo complementare per la TC nella gestione della siderosi trasfusionale (17). La RM, inoltre, ha il vantaggio di non presentare il rischio legato alle radiazioni ionizzanti e di non necessitare di alcuna preparazione particolare prima dell'esecuzione dell'esame, essendo senza somministrazione di mezzo di contrasto endovenoso (18, 19). La RM sta gradualmente sostituendo anche la biopsia epatica per la quantificazione del ferro (20, 21) per la sua affidabilità, non invasività e perché con tale metodica si può valutare contemporaneamente la presenza di un sovraccarico di ferro anche in altri organi quali la milza, il rene ed il cuore; si precisa che a livello cardiaco la biopsia non è possibile, quindi la RM è l'esame d'elezione (22, 2). La misura del contenuto di ferro tramite RM è una misura semiquantitativa, non assoluta ma relativa alla intensità del segnale del parenchima dell'organo oggetto di studio rispetto ad un altro preso come riferimento (es. muscoli paraspinali) (12). La ferritina è una proteina che a livello intracellulare immagazzina il ferro attraverso la formazione di involucri protettivi, evitando l'effetto tossico sull'organismo ed è in grado di rilasciare il ferro in caso di necessità: una minima quantità di ferritina è anche ritrovabile a livello ematico (ferritina sierica). La ferritina sierica è sostanzialmente proporzionale alla ferritina contenuta nelle cellule, e quindi misurando quella sierica è possibile misurare indirettamente il contenuto di ferro intra-cellulare. Uno stato infiammatorio o altre condizioni patologiche particolari come infezioni, neoplasie o morte cellulare massiva possono aumentare i valori della ferritina senza che vi sia un aumento del contenuto di ferro circolante. I depositi di ferritina e di emosiderina (forma denaturata della ferritina) rappresentano i maggiori depositi di ferro corporeo (6). Entrambe queste sostanze sono dotate di effetto paramagnetico, cioè assumono un debole effetto magnetico se sottoposte ad un campo magnetico esterno, pertanto aumentano la suscettibilità magnetica dei tessuti in cui si accumulano. Più precisamente, si ha un abbassamento dei valori del tempo di "rilassamento", con conseguente riduzione del segnale RM, che all'immagine si

traduce in una evidente ipointensità (l'organo con deposito risulta grigio scuro o tendente al nero)(8, 19, 22, 23).

Il ferro epatico è un eccellente indicatore di equilibrio di ferro trasfusionale (24) e dei depositi totali di ferro (25). A livello epatico esistono diversi protocolli di RM per quantificare il ferro.

La tecnica più utilizzata è quella introdotta dall'Università di Rennes in Francia (26) che permette la quantificazione del ferro come concentrazione di ferro epatico (LIC), distinguendo precisamente il sovraccarico di ferro di entità lieve, moderato e severo (LIC tra 36 e 300mmol/g), sebbene non sia in grado di quantificare in modo preciso quello massivo.

Il concetto della misurazione della quantità di ferro, tramite risonanza magnetica, si basa sul principio che la molecola va a causare una diminuzione del segnale RM prevalentemente nelle sequenze T2 e T2\*(23).

I primi studi erano stati effettuati con sequenze TSE, ma si è poi deciso di utilizzare le sequenze in eco di gradiente che si sono dimostrate più sensibili anche se con questa tecnica è necessario però lavorare sempre in fase, perchè le immagini acquisite con TE fuori fase vengono pesantemente condizionate dalla presenza di grasso nel fegato che crea un abbattimento di segnale simile a quello dato dal ferro. Le bobine utilizzate sono state quelle integrate alla RM, "Body", e non quelle di superficie che possono dare delle disomogeneità di segnale e quindi falsare i risultati. Per quanto riguarda lo spessore viene utilizzato quello di 10 mm, intervallato di 2mm, e un campo di vista (FOV) appena superiore alle dimensioni del paziente, per non avere troppa aria in esame e si utilizzano gli stessi parametri geometrici per tutte le sequenze in modo da poter avere la massima corrispondenza tra di esse:



<b>RM</b>	<b>da</b>	<b>1.5</b>	<b>T</b>
GRE	T1	120/4/90°	
GRE	DP	120/4/90°	
GRE	T2	120/4/20°	
GRE	T2*	120/14/20°	
GRE	T2*	120/21/20°	

Una volta acquisite le sequenze si potrà procedere all'analisi del segnale, andando a posizionare 3 ROI sul parenchima epatico e 2 ROI sui muscoli paravertebrali. Le ROI non devono essere troppo piccole, ma soprattutto non devono coprire tessuto alterato o patologico, e non devono coprire vene, arterie, rami biliari, aree di fibrosi, aree artefattate o qualsiasi cosa che crea una disomogeneità significativa all'interno dell'area. Una volta ottenuti, i valori medi delle ROI verranno inseriti nelle tabelle disponibili nel sito francese dell'Università di sito di Rennes a cui abbiamo fatto riferimento (26). Solitamente la T1 non viene utilizzata per le misure, mentre si utilizza almeno la DP, e se il valore di contenuto di ferro non è molto elevato allora si procede anche con le sequenze successive che sono più sensibili. Risultati di LIC <36 µmol/g indicano valori normali di concentrazione di ferro a livello epatico; risultati di LIC compresi tra 36 - 80 µmol/g sono valori di accumulo moderati mentre LIC maggiore di 80- 200 µmol/g corrispondono a concentrazioni elevate di ferro. Con LIC al di sopra di 300 µmol/g è probabile che vi sia la saturazione per tutte le sequenze e pertanto in questi casi gravi non risulterebbe utile la metodica per scegliere il trattamento terapeutico specifico.

Come detto, l'accumulo di ferro è tipico di tutti i pazienti affetti da malattie ematologiche che comportino un severo stato anemico cronico, richiedente continuo fabbisogno trasfusionale. Tra queste vanno ricordate innanzitutto le forme ereditarie (in particolare le talassemie), o tra le forme acquisite le sindromi mielodisplastiche. Una eccezione a questa regola è rappresentata dall'emoglobinuria parossistica

notturna (EPN), nella quale nonostante il severo stato anemico cronico, l'accumulo di ferro tende a non verificarsi anche in caso di severo fabbisogno trasfusionale (27).

L'emoglobinuria parossistica notturna è una anemia emolitica caratterizzata da crisi parossistiche di emolisi intravascolare derivante dalla mancanza nei globuli rossi (RBC) di regolatori del complemento di superficie CD59 e CD55 (28). I pazienti affetti da EPN perdono ferro attraverso l'urina, come emoglobina ed emosiderina, a causa dell'emolisi cronica intravascolare (28). Questa perdita di ferro è ben nota fin dalle prime descrizioni di EPN, infatti il nome coniato da Marchiafava è stato "EPN con perpetua emosiderinuria" (29). Di conseguenza, i pazienti affetti da EPN, anche in caso di marcata esigenza trasfusionale, sono più inclini a sviluppare carenza di ferro, piuttosto che un sovraccarico di ferro, perché la perdita di ferro nelle urine supera di solito l'intake iatrogeno di ferro derivante dalle trasfusioni(28-30). Il danno renale è raro, ma può produrre insufficienza renale cronica, come conseguenza dei depositi nella corticale renale di emosiderina e di trombosi microvascolare (31, 32). Inoltre questi pazienti hanno propensione a fenomeni tromboembolici di distretti venosi insoliti (vene spleniche, cerebrali ed epatiche) (32) e una variabile citopenia, con stigmate di insufficienza midollare e possibile sovrapposizione con anemia anaplastica. Il metabolismo e l'omeostasi del ferro possono essere controllati e modificati da alcuni farmaci che impediscono l'emolisi (33). Il farmaco Eculizumab è un inibitore della componente 5 del complemento approvato per il trattamento dell'emolisi intravascolare complemento-mediata dell'EPN: agisce legandosi alla proteina C5 del complemento inibendo in tal modo la formazione del complesso di attacco alla membrana ed evitando in tal modo l'emolisi. In studi prospettici, eculizumab ha portato a un controllo costante dell'emolisi intravascolare, con conseguente stabilizzazione dell'emoglobina e ridotto bisogno trasfusionale (33, 34). Tuttavia, i benefici ematologici dell'eculizumab sono eterogenei tra i pazienti, probabilmente a causa della comparsa di un'emolisi extravascolare C3-mediata (36-38). Il trattamento a lungo termine con eculizumab si è dimostrato efficace e sicuro (34, 35).

La RM ha un notevole impatto sulla diagnosi delle complicanze addominali dell'EPN (39) permettendo una valutazione qualitativa e quantitativa al fine di consentire uno studio complessivo della distribuzione del ferro (40, 41). Il razionale dell'analisi del segnale si basa sul presupposto che l'intensità ottenuta in RM nelle differenti sequenze dipende dalle caratteristiche chimico-fisiche del tessuto in analisi e quindi dal micro-ambiente molecolare in cui sono immersi gli "spins"; è infatti noto che nelle sequenze T2 pesate, il tempo di rilassamento T2 diminuisce con l'aumentare del contenuto di emosiderina .

Nei pazienti affetti da EPN, proprio a causa dell'accumulo del ferro, l'analisi del segnale mostra dei tipici segnali di RM che sono: nel rene il basso segnale della corticale rispetto alla midollare, da emosiderosi renale (42), così come si avrà un basso segnale, quindi un ipointensità diffusa, a livello del parenchima splenico ed epatico, fino a rilevare, qualora in una fase avanzata di malattia, complicanze vascolari come per esempio sindrome Budd-Chiari e/o trombosi delle vene spleniche.

## **Obiettivi**

In questo studio, mediante l'uso della RM come esame strumentale del fegato, rene, milza (26, 39, 40) e cuore (43, 44) e attraverso la correlazione con esami di laboratorio specifici (sideremia, ferritina e saturazione della transferrina) abbiamo studiato la compartimentalizzazione del ferro in pazienti affetti EPN e trattati con eculizumab (38) ed in particolare abbiamo verificato il valore aggiunto che la RM può avere nella diagnosi e nel follow-up dei pazienti affetti da EPN in trattamento farmacologico con Eculizumab (35) .

## Materiali e metodi

### *Popolazione di pazienti*

Lo studio ha incluso 17 pazienti affetti da EPN con caratteristiche cliniche differenti, trattati con eculizumab e valutati in tempi diversi con metodologie cliniche, strumentali e laboratoristiche a vario livello. La valutazione dell'assetto del ferro è stata effettuata con una misurazione biochimica (sideremia, ferritina e saturazione della transferrina) e combinata con la RMN (valutazione semi quantitativa T2\*) per rilevare eventuale accumulo di ferro in quattro organi bersaglio tra cui:

1) fegato 2) rene 3) milza e 4) cuore, classificandoli per epoca a diversi tempi, prima del trattamento con eculizumab (**PRE o GRUPPO A**) e durante il trattamento in due tempi successivi (**POST o GRUPPO B**: con tempo di osservazione di 2-44 mesi; **POST 2 o GRUPPO C**: con tempo di osservazione di 48-90 mesi).

In dettaglio i pazienti valutati del GRUPPO A , pre trattamento, sono 3, studiati per gli organi fegato, rene e milza.

<b>Popolazione di pazienti totale con EPN: <u>17</u></b>
<b>17 pazienti trattati con Eculizumab</b> <b>17 pazienti analizzati durante il trattamento (ultimo follow up &gt; 4 anni)</b> .

Popolazione di pazienti totale con EPN: <u>17</u>	ORGANI STUDIATI con RMN			
	RENE	FEGATO	MILZA	CUORE
<b><u>GRUPPO A</u>: 3 paz .analizzati prima del trattamento (PRE)</b>	X	X	X	
<b><u>GRUPPO B o Post-1</u>: 17 paz. 2-44 mesi dall'inizio del trattamento (mediana 21 mesi)</b>	X	X	X	
<b><u>GRUPPO C o Post-2</u>: 12 paz. (9 valutati anche cuore) 48-90 mesi dall'inizio del trattamento (mediana 74 mesi)</b>	X	X	X	X

***Gruppo A o Pre trattamento: 3 pazienti: valutazione dell'accumulo di ferro a livello del fegato, reni e milza.***

***Gruppo B o POST 1: 17 pazienti: valutazione dell'accumulo di ferro a livello del fegato, reni e milza.***

***Gruppo C o POST 2: 12 pazienti: valutazione dell'accumulo di ferro a livello del fegato, reni e milza (in 9 pazienti è stata valutato anche il cuore).***

Il follow-up standards del trattamento con eculizumab ha previsto: conta dei globuli rossi, LDH e ferro e citometria a flusso per GPI-molecole e per la C3-binding (36) . Eculizumab è stato somministrato in accordo ai protocolli standards internazionali (33, 34) e la risposta clinica è stata classificata come ottimale (trasfusione indipendente, Hb> 11 g / dL), maggiore (trasfusione-indipendente, emoglobina <11 g / dL), parziale (riduzione> 50% del fabbisogno trasfusionale) e minore (ridotto LDH senza diminuzione significativa del fabbisogno trasfusionale) (36).

## *Tecnica di risonanza magnetica*

Dopo il consenso informato, secondo l'IRB locale, l'esame RM di rene, fegato, milza e cuore è stato eseguito secondo un piano di scansione assiale con immagini non contigue per il campionamento degli accumuli diffusi di ferro. Non è stato iniettato mdc e.v. Non sono state effettuate sequenze per individuare lesioni focali epatiche, renali e/o spleniche. La sequenza T2 \* è stata eseguita con un RM 1,5 tesla scanner whole-body (Gyroscan, Philips, Andover, MA, USA), utilizzando quattro sequenze gradient-echo e una sequenza spin-echo. In virtù delle proprietà paramagnetiche del ferro, il sovraccarico di quest'ultimo determina una diminuzione del tempo di rilassamento T2 \*, in risonanza magnetica. Questo dà una tipica immagine degli organi coinvolti, con una diminuzione (nero) di intensità di segnale (SI) corrispondente al sovraccarico di ferro, mentre gli organi con contenuto di ferro normale appaiono bianchi. La SI è stata misurata sulle immagini ottenute con ogni sequenza tramite tre regioni di interesse inserite nei vari organi e a livello dei muscoli paraspinali. I rapporti di SI sono stati ottenuti in confronto ai muscoli, e infine trasformati in contenuto di ferro calcolato (CIC) secondo il metodo convalidato descritto da Gandon et al (26, 7).

Per il calcolo della concentrazione di ferro intra-epatico è stato utilizzato l'algoritmo del "Medical Imaging" dell'Università di Rennes (26), con sequenze T2\* a diversi tempi di eco (4-14-21) e con sequenze T1 GRE e PD GRE (120/4/90).

CIC del fegato è stata espressa come  $1 \text{ mol} / \text{g}$  (26) mentre per la milza e il rene, CIC è stato riportato come unità arbitraria perché la convalida formale mediante biopsie non è mai stata eseguita per ragioni mediche ed etiche (19, 42).

Per la valutazione dell'accumulo di ferro intramiocardico abbiamo eseguito una sequenza T2\* a diversi tempi di eco con la misurazione del tempo di decadimento espresso in ms: valori  $>$  di 20ms risultano non suggestivi di accumulo di ferro intramiocardico; valori compresi tra 10 e 20 ms risultano suggestivi di accumulo lieve-moderato; valori  $<$  10 ms invece sono espressione di severo accumulo di ferro

intramiocardico. Inoltre un tempo di decadimento di 20 ms risulta equivalente ad una concentrazione di ferro intramiocardica di 1,16 mg/g (43, 44).

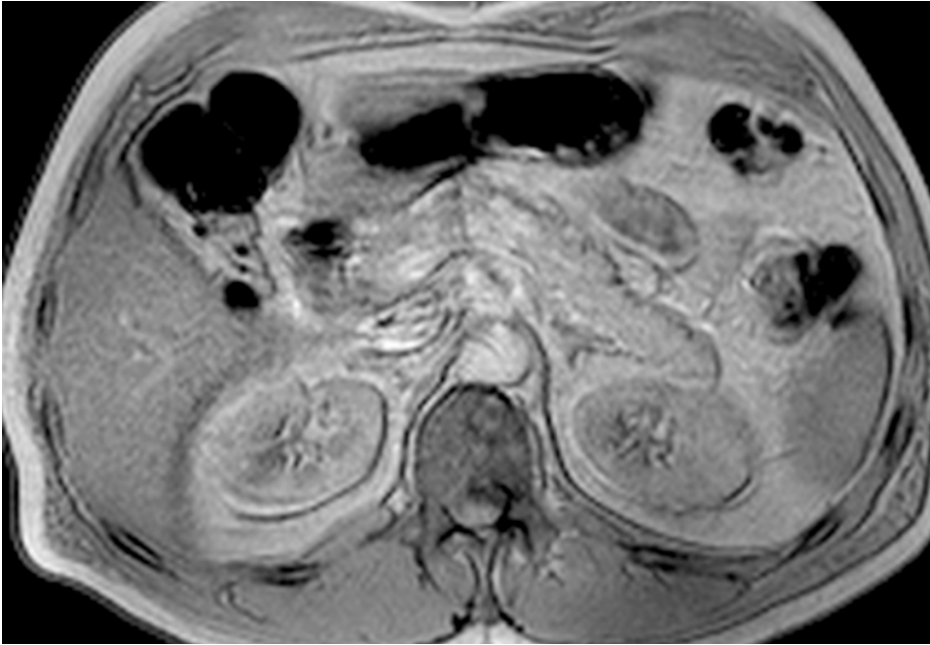
### *Analisi statistica*

L'analisi statistica è stata eseguita mediante test t-Student, test chi-quadro e correlazione di Pearson. E' stato ritenuto statisticamente significativo il test con valori di  $P < 0,05$ . L'analisi statistica è stata effettuata mediante il software Statview 8,0.

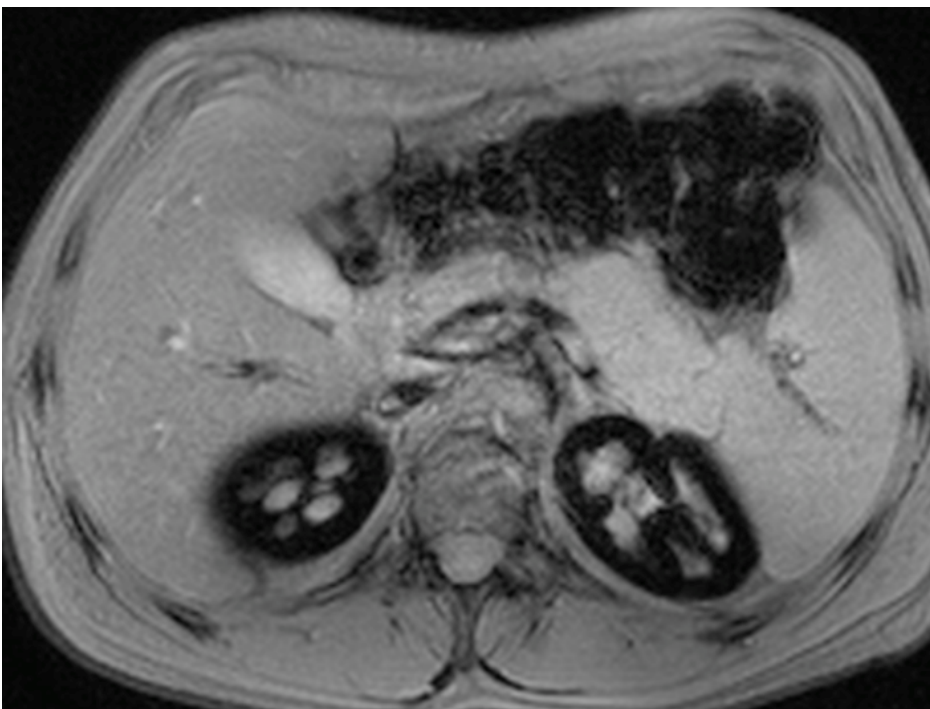


Esempi di RMN del RENE, FEGATO E MILZA di PAZIENTI SANI E CON EPN,  
TRATTATI E NON, con ECULIZUMAB

Esempio di un soggetto sano e studiato con sequenza di risonanza magnetica T2 pesata (Tempo di eco: 4). Si apprezza un normale ed omogeneo segnale a livello della corticale renale.

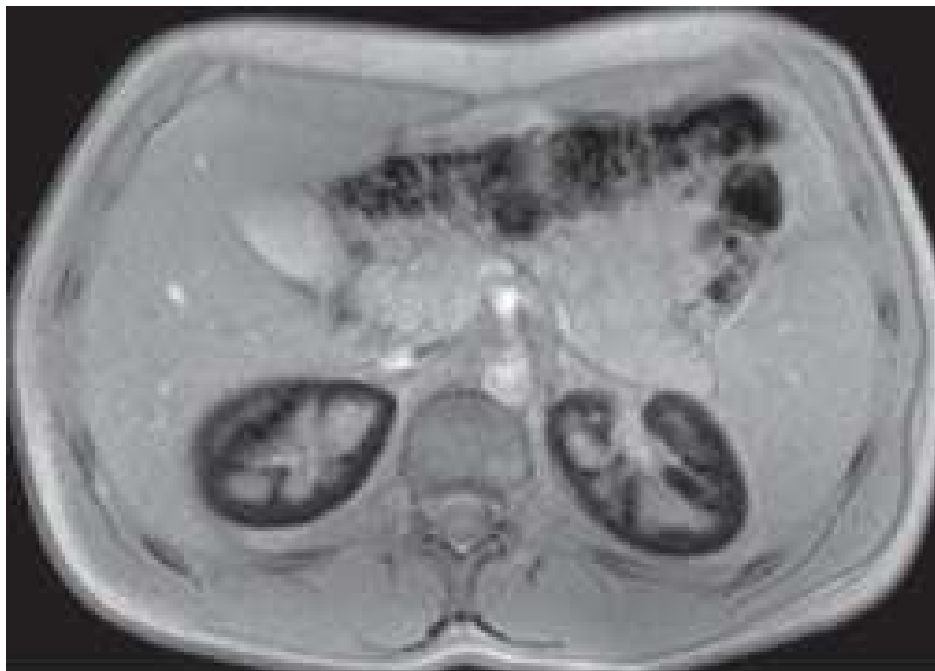


Esempi di soggetti affetto da EPN , non trattati con Eculizumab e studiatati con sequenza di risonanza magnetica T2 pesata (Tempo di eco: 4). Si apprezza un basso segnale a livello della corticale renale e segnale normale a livello epatico e splenico.



Esempi di soggetto affetto da EPN studiato con sequenza di risonanza magnetica T2 pesata (Tempo di eco: 4), trattato con Eculizumab (fig.2): si apprezza un ripristino del normale segnale della corticale renale

*Figura 1*

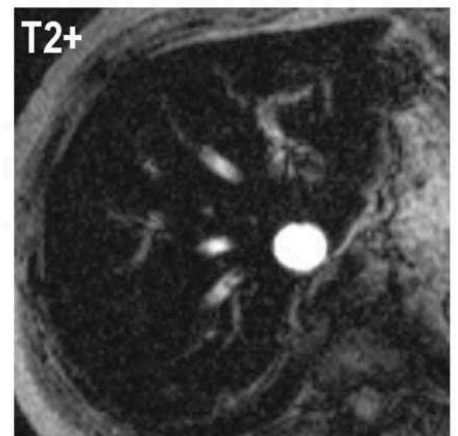
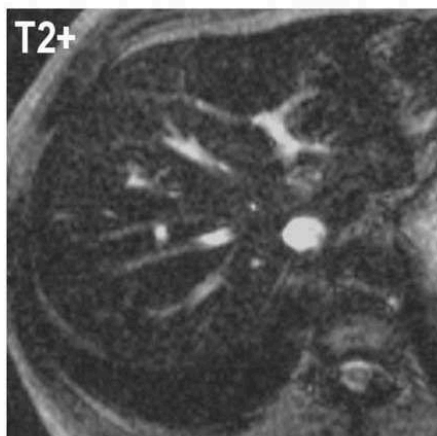
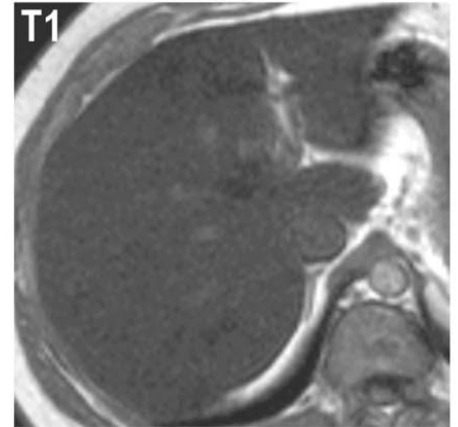
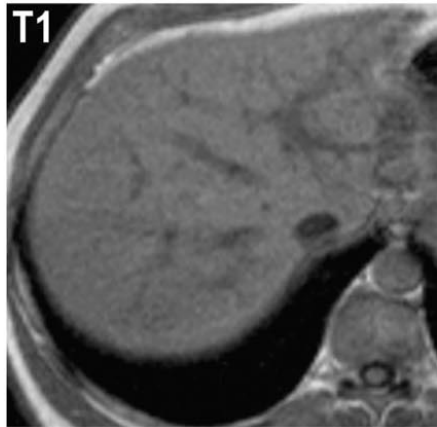
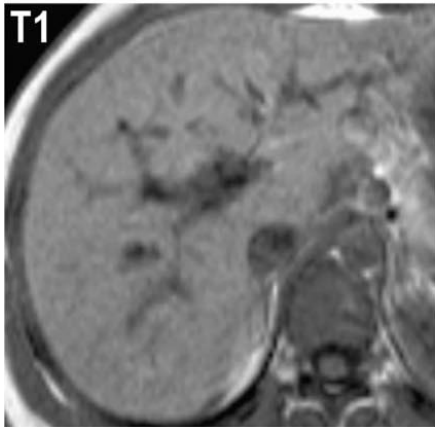


*Figura 2*

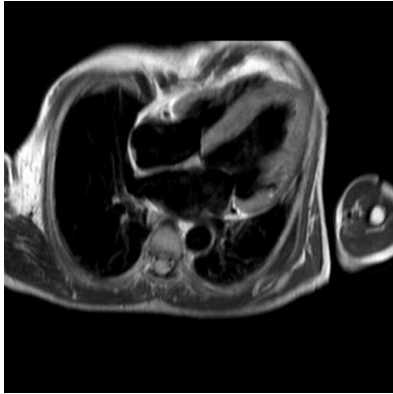


### Esempi di RMN del FEGATO:

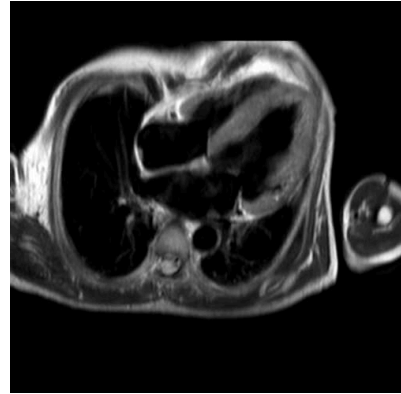
Soggetti affetti da Emoglobinuria parossistica notturna , non trattati con Eculizumab e studiati con sequenza di risonanza magnetica T1 e T2\* pesata (Tempo di eco: 4). Si apprezzano sequenze assiali di tre pazienti con un progressive accumulo di ferro e corrispondente segnale del parenchima epatico basso.



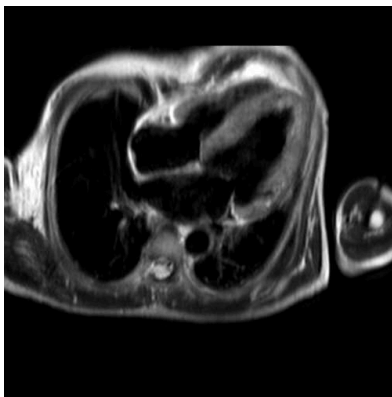
Esempi di RMN del cuore:



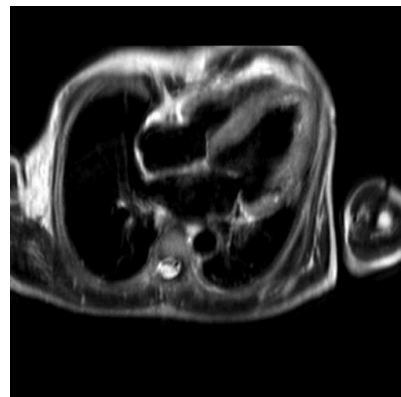
TE 45



TE 60



TE 75



TE 90

Fig: Le immagini mostrano un esempio di acquisizione di immagini T2 a differenti tempi di “echo”, 45, 60, 75 e 90 su cui è stata effettuata l’analisi molecolare del segnale miocardico.

## Risultati

Dall'analisi finale, i risultati di questo nostro studio dimostrano che i 3 pazienti liberi da trattamento con eculizumab (gruppo A o pre), come atteso, erano caratterizzati da una marcata emolisi intravascolare, generalmente associata a livelli di ferritina sierica normali/bassi. Tutti e 3 questi pazienti mostravano un modello omogeneo di distribuzione del ferro con siderosi della corteccia renale e assenza di deposito di ferro epato-splenico (FIG 1) (31, 39-41). Nei gruppi in trattamento con eculizumab (follow-up mediano 50 mesi), rispettivamente gruppo B (17 pazienti) e C (12 pazienti), i pazienti mostravano un pattern di distribuzione del ferro completamente diverso, in cui si evidenzia la tendenza a normalizzare progressivamente la siderosi renale (maggiormente nel gruppo C, con follow-up più lungo), con l'eccezione di coloro che subiscono residua emolisi intravascolare e una percentuale rilevante di pazienti affetti da EPN, ha sviluppato un sovraccarico di ferro nel fegato, che spesso è stato anche associato ad un sovraccarico di ferro della milza, come dimostrato anche da un aumento dei livelli di ferritina e di saturazione della transferrina. (FIG 1 e 2).

Si è rilevata infine una diretta correlazione tra la ferritina e il contenuto di ferro calcolato in fegato e milza (FIG 3 e 4). Per quanto riguarda il cuore, in nessun caso (9 pazienti) c'è stato accumulo (FIG 5).

I risultati del nostro lavoro sono sintetizzati nelle varie figure.

Fig.1 : Confronto del contenuto di Ferro calcolato (CIC) di rene, fegato e milza  
nei pazienti pre (I riga da sinistra) e post trattamento al tempo 1 o Gruppo  
B (riga centrale) e al tempo 2 o Gruppo C (III riga da sinistra):  
*Da rilevare le drastiche e significative modifiche della distribuzione del*  
*ferro come conseguenza del trattamento con eculizumab:*  
*progressiva riduzione della siderosi renale (specie nel POST 2) e*  
*parallelo modesto accumulo di ferro nel fegato e nella milza.*

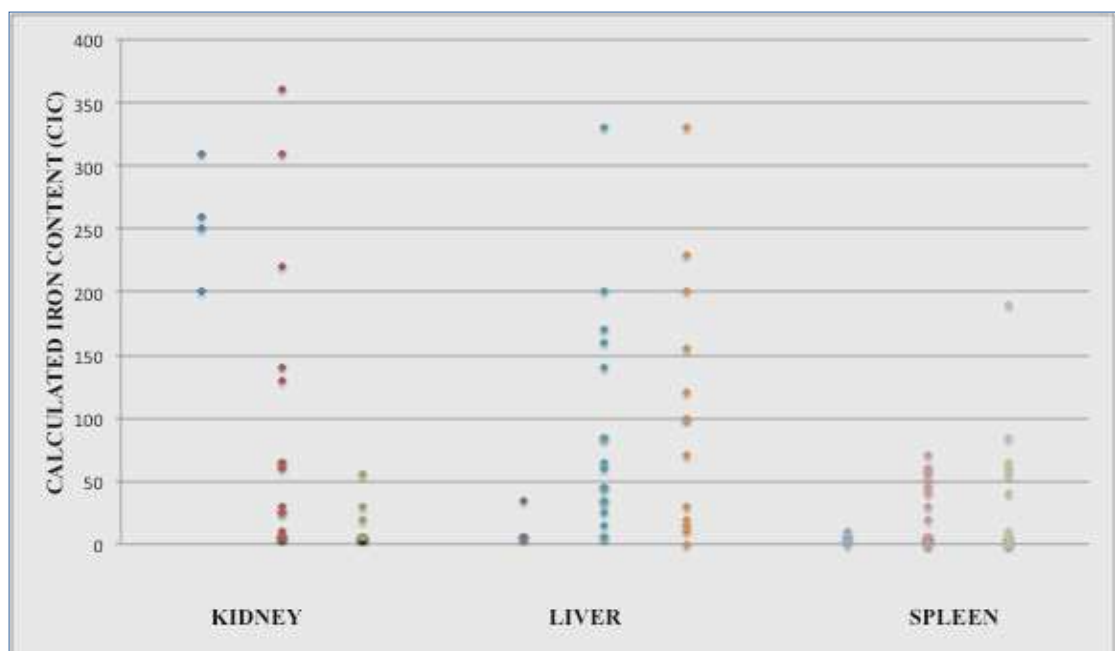
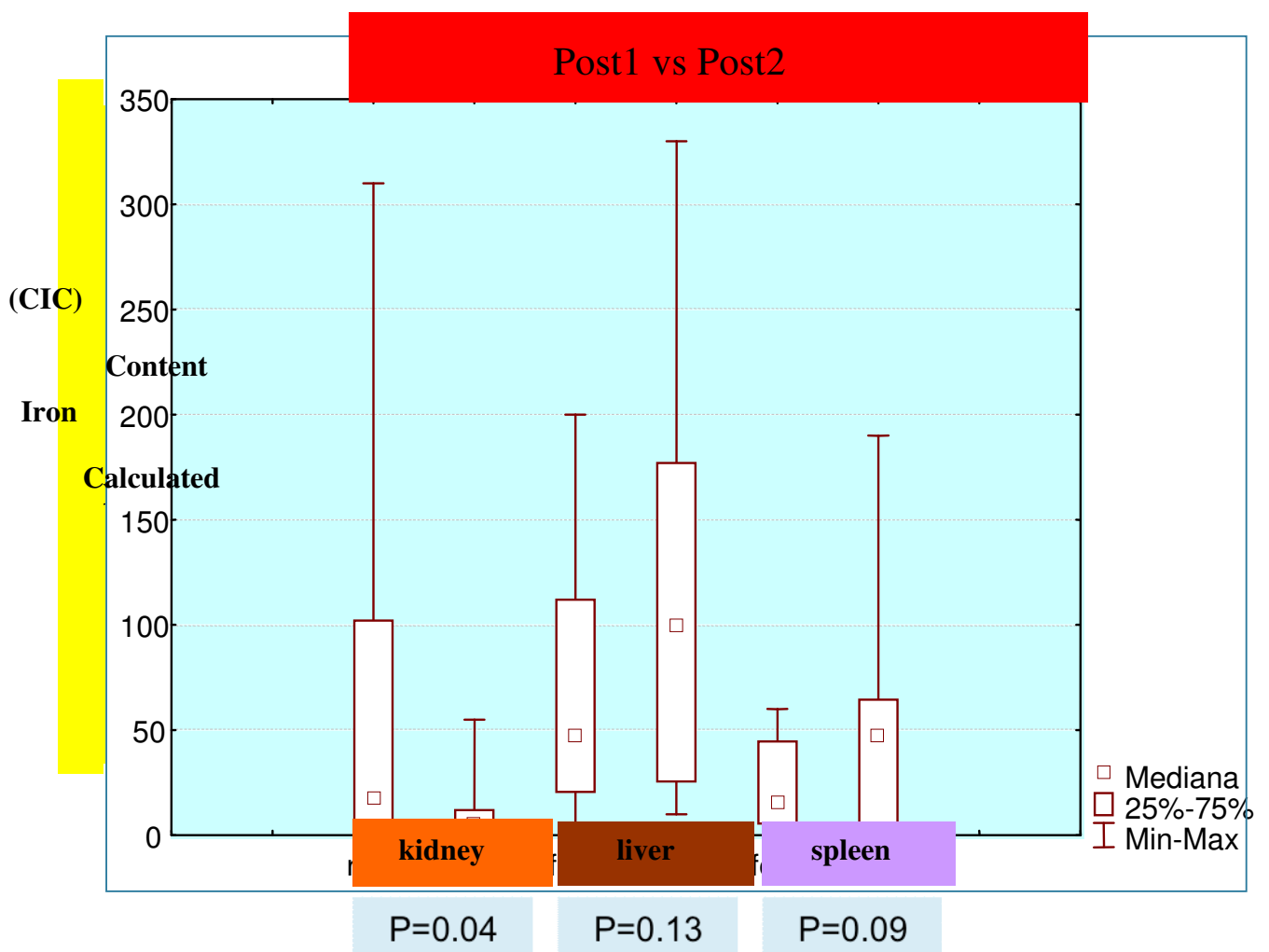


Fig.2: Confronto del contenuto di Ferro calcolato (CIC) di rene, fegato e milza nei

pazienti trattati con eculizumab nei diversi tempi di f.up: POST 1 e POST 2:

*Anche in questo caso da rilevare sempre, la progressiva riduzione della siderosi renale e il parallelo accumulo di ferro nel fegato e nella milza.*



*Test di Wilcoxon per dati appaiati*

Figura 3: CORRELAZIONE TRA CIC SPLENICO e FERRITINA

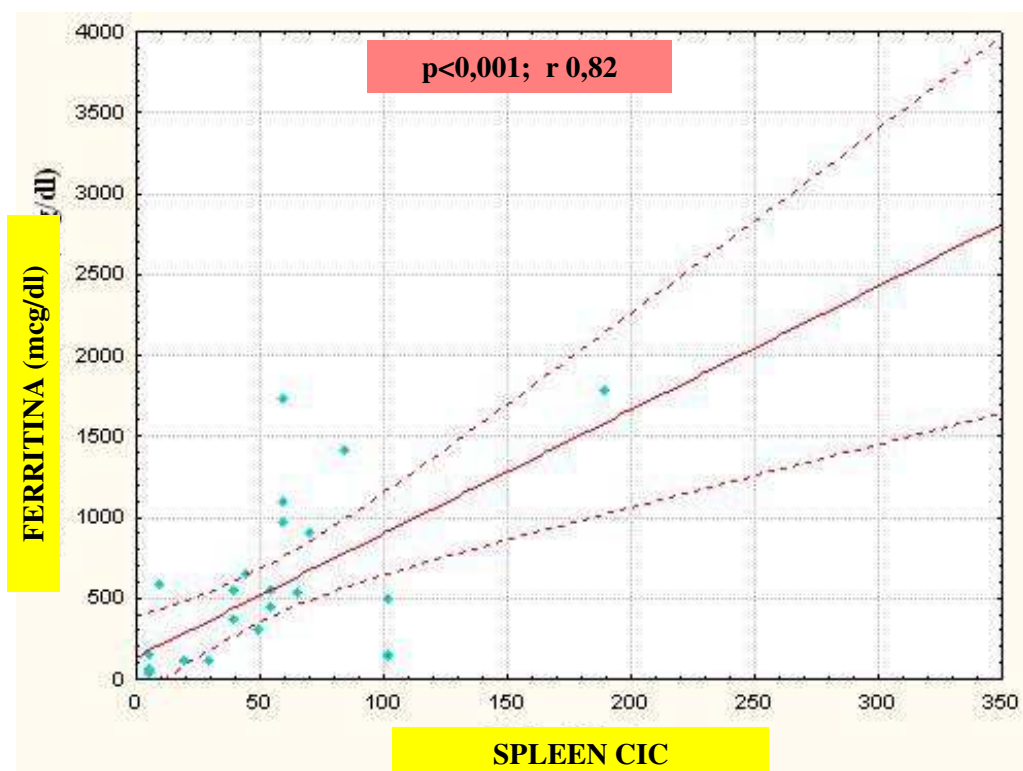


Figura 4: CORRELAZIONE TRA CIC EPATICO e FERRITINA

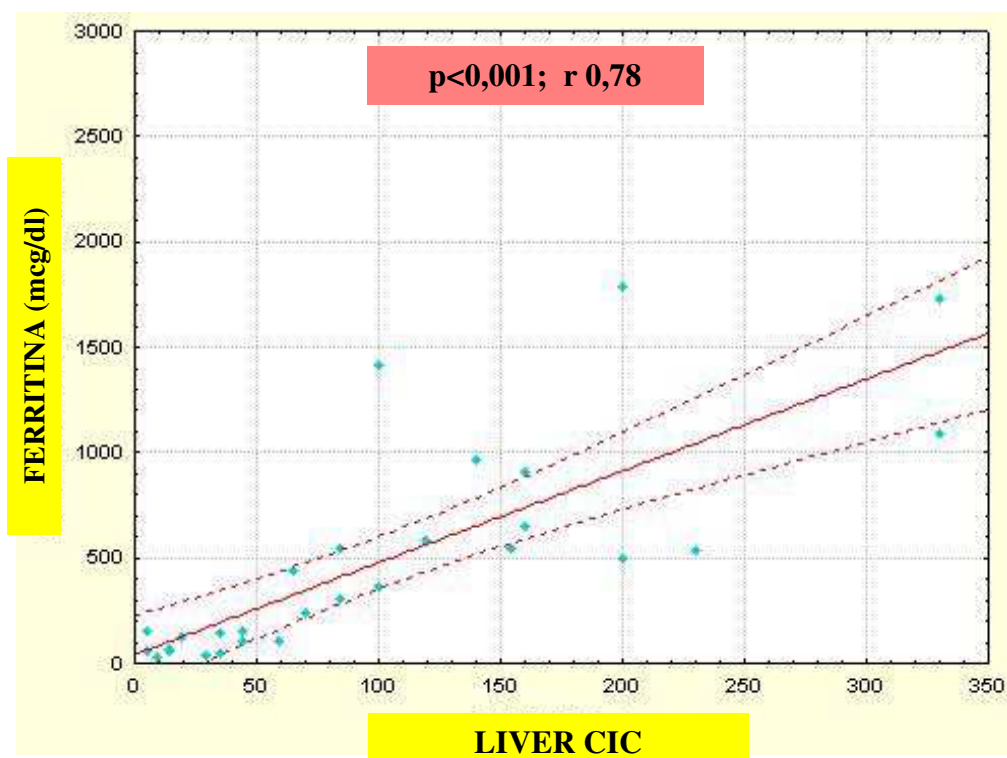




Fig.5: RMN T2\* nel CUORE

Correlazione della sequenza T2\* a diversi tempi di echo con la durata del trattamento iniziata nel POST 2.

*La misurazione del tempo di decadimento è espresso in ms:*

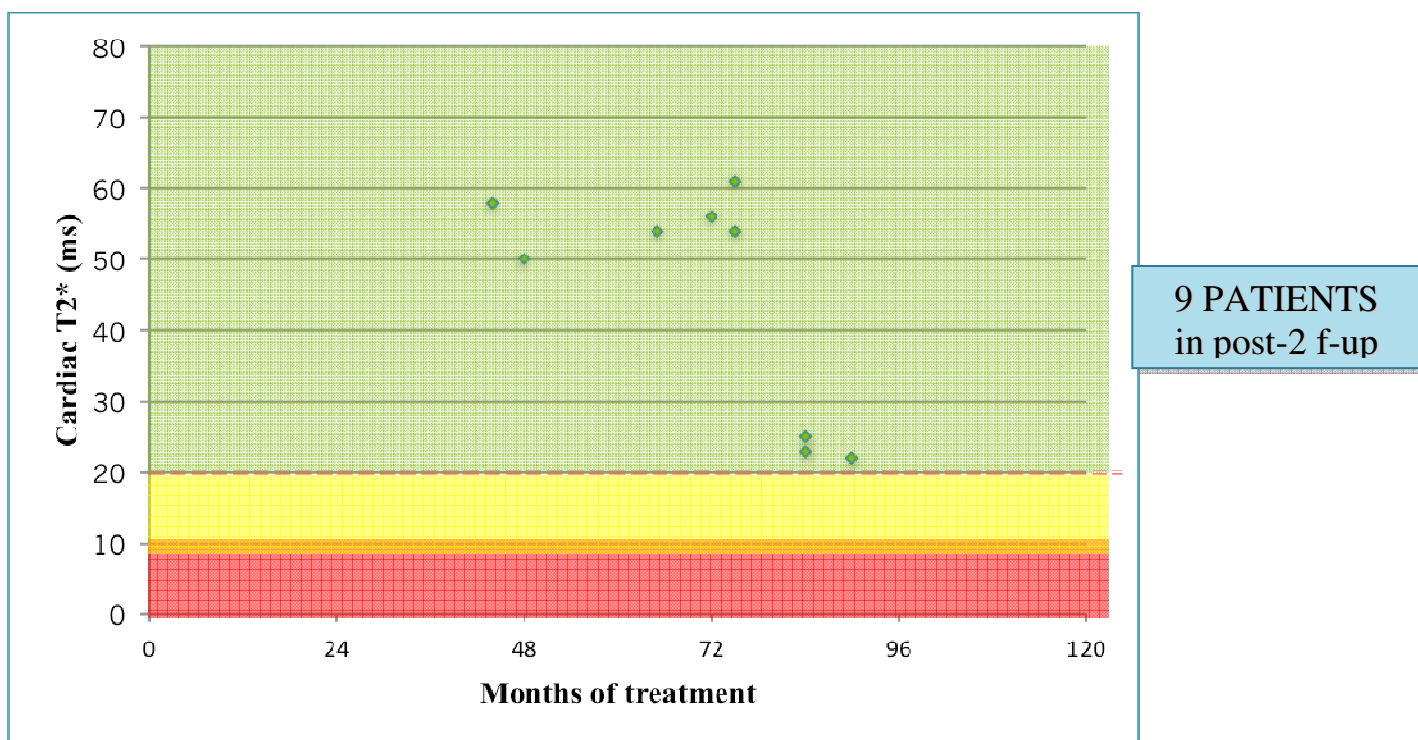
*valori > 20ms risultano non suggestivi di accumulo di ferro intra-miocardico.*

*valori compresi tra 10 e 20 ms risultano suggestivi di accumulo lieve-moderato.*

*valori < 10 ms invece sono espressione di severo accumulo di ferro intra-miocardico.*

*Un tempo di decadimento di 20 ms risulta equivalente ad una concentrazione di ferro intra-miocardica di 1,16mg/g.*

*In nessun caso si è avuto accumulo.*



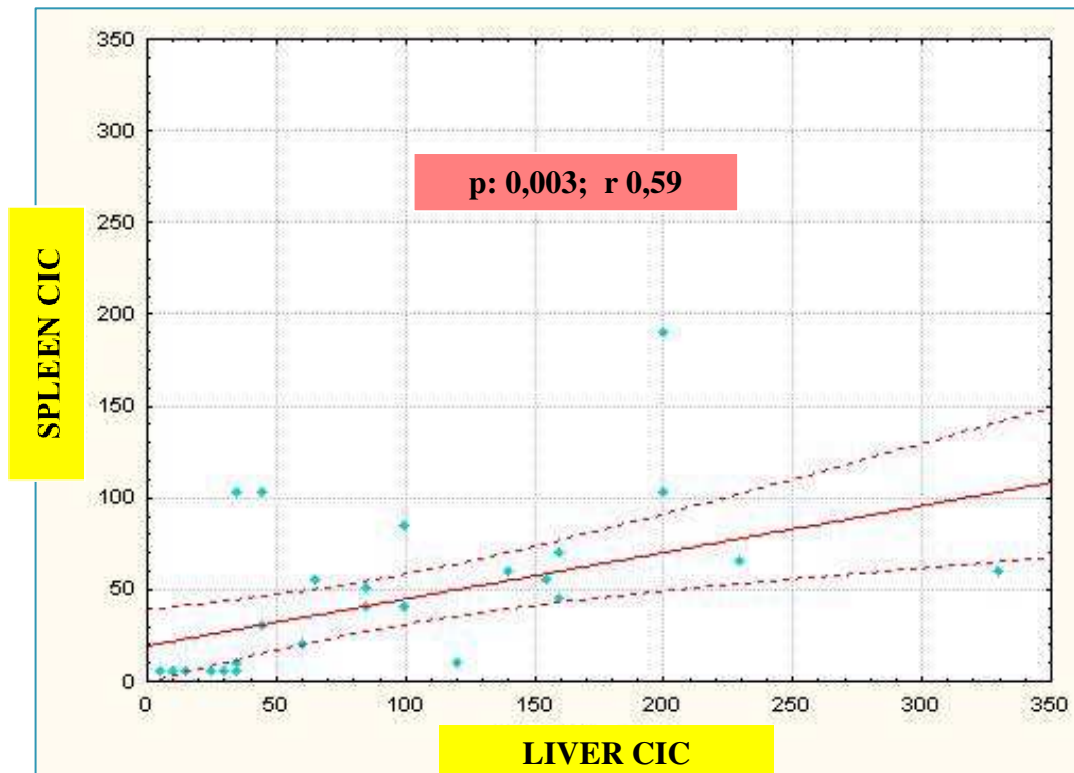
Normal CMR T2\*>20 ms

Mild/Moderate C.I.O  
T2\*:10-20 ms

Severe C.I.O.: T2\*<10 ms

20 ms=1,16 mg/g  
of myocardial iron concentration

Fig 6: Presenza di una correlazione lineare tra CIC splenico e renale.  
Nessuna correlazione invece, tra CIC splenico, epatico, renale e cardiaco.



## Discussione

Le più recenti innovazioni tecnologiche sia in ambito hardware che software hanno permesso la realizzazione di esami di Risonanza Magnetica dei vari organi come fegato, reni, milza e cuore che oltre a fornire dei fini dettagli anatomici e funzionali permettono una reale caratterizzazione “in vivo” dei processi patologici che interessano i diversi parenchimi. Come spesso sta accadendo negli ultimi anni però, soprattutto in diagnostica per immagini, il progresso tecnologico è talmente rapido che spesso risulta difficile verificare il valore aggiunto che tali metodiche di ultima generazione sono in grado di fornire in ambito clinico. In questo studio, durato complessivamente circa 7 anni, abbiamo verificato il valore aggiunto che la Risonanza Magnetica può avere nella diagnosi e nel follow-up dei pazienti affetti da EPN in trattamento farmacologico con Eculizumab, riscontrando l'enorme potenzialità della RM, che può fornire informazioni fondamentali in modo del tutto “non invasivo”.

L'emoglobinuria parossistica notturna è una anemia emolitica caratterizzata da crisi parossistiche di emolisi intravascolare derivante dalla mancanza nei globuli rossi (RBC) di regolatori del complemento di superficie CD59 e CD55 (28). I pazienti affetti da EPN perdono ferro attraverso l'urina, come emoglobina ed emosiderina, a causa dell'emolisi cronica intravascolare (28). Di conseguenza, i pazienti affetti da EPN, anche in caso di marcata esigenza trasfusionale, sono più inclini a sviluppare carenza di ferro, piuttosto che un sovraccarico di ferro, perché la perdita di ferro nelle urine supera di solito l'intake iatrogeno di ferro derivante dalle trasfusioni (28-30).

Il metabolismo e l'omeostasi del ferro possono essere controllati e modificati da alcuni farmaci che impediscono l'emolisi (33). Tra questi vi è Eculizumab, un inibitore della componente 5 del complemento approvato per il trattamento dell'emolisi intravascolare complemento-mediata dell'EPN. In studi prospettici, eculizumab ha portato a un controllo costante dell'emolisi intravascolare, con conseguente stabilizzazione dell'emoglobina e ridotto bisogno trasfusionale (33, 34).

Tuttavia, i benefici ematologici dell'eculizumab sono eterogenei tra i pazienti, probabilmente a causa della comparsa di un'emolisi extravascolare C3-mediata (36-38). Il trattamento a lungo termine con eculizumab si è dimostrato in ogni modo efficace e sicuro (34, 35).

La RM notevole impatto sulla diagnosi delle complicanze dell'EPN (39) permettendo una valutazione qualitativa e quantitativa, al fine di consentire uno studio complessivo della distribuzione del ferro (40, 41). Essa presenta notevoli vantaggi, in primo luogo di non avere il rischio legato alle radiazioni ionizzanti (a differenza della TC) e di non necessitare di alcuna preparazione particolare prima dell'esecuzione dell'esame, essendo senza somministrazione di mezzo di contrasto endovenoso. Con tale metodica, a differenza della biopsia, si può valutare contemporaneamente la presenza di un sovraccarico di ferro anche in altri organi quali milza, rene ed in maniera "esclusiva" a livello del cuore (in quanto a tale livello, la biopsia non è praticabile). La RM, infine, non è inficiata da stati infiammatori o dall'intensità della terapia trasfusionale, come invece accade, in alcuni casi, con i parametri ematochimici di laboratorio.

Il concetto della misurazione della quantità di ferro, tramite risonanza magnetica, si basa sul principio che la molecola va a causare una diminuzione del segnale RM prevalentemente nelle sequenze T2 e T2\*. I depositi di ferritina e di emosiderina che rappresentano i maggiori depositi di ferro corporeo, infatti sono entrambe dotate di effetto paramagnetico, cioè assumono un debole effetto magnetico se sottoposte ad un campo magnetico esterno, pertanto aumentano la suscettibilità magnetica dei tessuti in cui si accumulano. Più precisamente, si ha un abbassamento dei valori del tempo di "rilassamento", con conseguente riduzione del segnale RM, che all'immagine si traduce in una evidente ipointensità (l'organo con deposito risulta grigio scuro o tendente al nero); Nei pazienti affetti da EPN, proprio a causa dell'accumulo del ferro, l'analisi del segnale mostra una tipica semeiotica di RM rappresentata nel rene dal basso segnale della corticale rispetto alla midollare (da emosiderosi renale), così come si avrà un basso segnale, quindi un ipointensità

diffusa, a livello del parenchima splenico ed epatico, fino a rilevare, qualora in una fase avanzata di malattia, complicanze vascolari come per esempio sindrome Budd-Chiari e/o trombosi delle vene spleniche.

Il ferro epatico è un eccellente indicatore di equilibrio di ferro trasfusionale e dei depositi totali di ferro dell'organismo. A livello epatico esistono diversi protocolli di RM per quantificare il ferro. La tecnica più utilizzata è quella introdotta dall'Università di Rennes in Francia che permette la quantificazione del ferro come concentrazione di ferro epatico (LIC), distinguendo precisamente il sovraccarico di ferro di entità lieve, moderato e severo (LIC tra 36 e 300mmol/g), sebbene non sia in grado di quantificare in modo preciso quello massivo.

Una volta ottenuti, i valori medi delle ROI verranno inseriti nelle tabelle disponibili nel sito francese dell'Università di sito di Rennes a cui abbiamo fatto riferimento.

Per la valutazione dell'accumulo di ferro intramiocardico abbiamo eseguito una sequenza T2\* a diversi tempi di echo con la misurazione del tempo di decadimento espresso in ms: valori > di 20ms risultano non suggestivi di accumulo di ferro intramiocardico; valori compresi tra 10 e 20 ms risultano suggestivi di accumulo lieve-moderato; valori < 10 ms invece sono espressione di severo accumulo di ferro intramiocardico.

I risultati di questo studio, dalla nostra analisi statistica, dimostrano che l'omeostasi del ferro subisce cambiamenti drammatici durante l'azione efficace del trattamento anti-complemento. Infatti, con eculizumab, l'inibizione dell'emolisi intravascolare previene la carenza di ferro tipica della EPN e normalizza progressivamente la siderosi renale, maggiormente nel gruppo C (che ricordiamo formato da 12 pazienti con follow-up lungo, 48-90 mesi dall'inizio del trattamento). Inoltre, molti pazienti diventano inclini a sviluppare un sovraccarico di ferro: la spiegazione di questo fenomeno, ossia di un moderato/grave sovraccarico di ferro nel fegato e milza, è da attribuire, almeno in parte, alla necessità di trasfusioni, che richiedono una quota rilevante dei pazienti e in parte a fenomeni di emolisi extravascolare complemento-mediata.

Se questo sovraccarico richiede una regolare chelazione del ferro è ancora poco chiaro: nella nostra esperienza nella maggior parte dei casi il sovraccarico di ferro era considerato sub-clinico e la chelazione del ferro non è stata iniziata. Questo approccio conservativo è supportato da rivalutazione a lungo termine, che ha dimostrato che il contenuto di ferro può leggermente aumentare nel tempo nel fegato senza alcuna conseguenza clinica. Probabilmente interventi terapeutici sono limitati a pazienti che continuano a ricevere trasfusioni, ma suggerisce che l'omeostasi del ferro deve essere valutata a lungo termine, in tutti i pazienti affetti da EPN con eculizumab, sia con markers biochimici ma soprattutto con la RM. I risultati di questo studio, sebbene in un gruppo limitato di pazienti, confermano infatti l'utilità e l'importanza della RM nei pazienti affetti da EPN, nel monitorare la risposta alla terapia con eculizumab.

## **Limiti**

Potenziati limiti del nostro studio sono rappresentati dalla mancanza della correlazione con dati isto-patologici, dalla ridotta numerosità del campione ma questo è uno studio preliminare che sarà seguito da una più larga popolazione di pazienti; va ricordato inoltre la estrema rarità di tale malattia.

## **Conclusioni**

I risultati di questo studio confermano l'utilità e l'importanza della RM nei pazienti affetti da EPN, nel monitorare la risposta alla terapia con eculizumab, permettendo di identificare cambiamenti sostanziali nell'omeostasi del ferro nei vari organi esplorati (fegato, rene, milza e cuore). La RM offre notevoli vantaggi rispetto alla biopsia ed è strettamente correlata con i parametri ematochimici per la valutazione dell'assetto del ferro.

## BIBLIOGRAFIA

1. Danet I.M., Semelka R.C., Braga L., MR Imaging of diffuse liver disease, "Radiol.Clin.N.Am."2003;41:67-87
2. Sielgeman E.S., Mitchell D.G., Semelka R.C., Abdominal iron deposition: metabolism, MR findings and clinical importance, "Radiology", 1996;199:133-22
3. Brandhagen D.J., Fairbanks V.F., Batts K.P., et al. Update on hereditary hemochromatosis and HFE gene, "Mayo Clin.Proc"., 1999;74:917-921
4. Bottomley SS. Secondary iron overload disorders. Semin Hematol. 1998; 35:77-86.
5. Niederau C., Stremmel W., Strohmeyer G.W., Clinical spectrum and management of hemochromatosis, "Baillieres Clin.Haematol.", 1994;7:881-901
6. Niederau C., Ehrardt A., Haussinger D. et al. Hemochromatosis and liver, "J.Hepatol.", 1999;30:6-11
7. Deugnier Y, Turlin B. Pathology of hepatic iron overload. World J Gastroenterol. 2007 Sep 21;13:4755-60.
8. Ernst O., Sergent G., Bonvarlet P. et al. Hepatic iron overload: Diagnosis and quantification with MR imaging, "AJR Am J. Roentgenol.", 1997;168:1205-1208
9. Pakbaz, Z., Fischer, R., Fung, E., Nielsen, P., Harmatz, P. & Vichinsky, E. (2007) Serum ferritin underestimates liver iron concentration in transfusion independent thalassemia patients as compared to regularly transfused thalassemia and sickle cell patients. Pediatric Blood and Cancer, 49, 329–332.
10. Ambu, R., Crisponi, G., Sciot, R., Van Eyken, P., Parodo, G., Iannelli, S., Marongiu, F., Silvagni, R., Nurchi, V. & Costa, V. (1995) Uneven hepatic iron and phosphorus distribution in beta-thalassemia. Journal of Hepatology, 23, 544–549.



11. Emond, M.J., Bronner, M.P., Carlson, T.H., Lin, M., Labbe, R.F. & Kowdley, K.V. (1999) Quantitative study of the variability of hepatic iron concentrations. *Clinical Chemistry*, 45, 340–346.
12. Angelucci E., Giovagnoni A., Valeri G. et al., Limitations of magnetic resonance imaging in measurement of hepatic iron, “Blood”, 1997;90:4736-4742
13. Chapman, R.W., Williams, G., Bydder, G., Dick, R., Sherlock, S. & Kreel, L. (1980) Computed tomography for determining liver iron content in primary haemochromatosis. *British Medical Journal*, 280, 440–442.
14. Goldberg, H.I., Cann, C.E., Moss, A.A., Ohto, M., Brito, A. & Federle, M. (1982) Noninvasive quantitation of liver iron in dogs with hemochromatosis using dual-energy CT scanning. *Investigative Radiology*, 17, 375–380.
15. Porter, J., Galanello, R., Saglio, G., Neufeld, E.J., Vichinsky, E., Cappellini, M.D., Olivieri, N., Piga, A., Cunningham, M.J., Soulieres, D., Gattermann, N., Tchernia, G., Maertens, J., Giardina, P., Kwiatkowski, J., Quarta, G., Jeng, M., Forni, G.L., Stadler, M., Cario, H., Debusscher, L., Della Porta, M., Cazzola, M., Greenberg, P., Alimena, G., Rabault, B., Gathmann, I., Ford, J.M., Alberti, D. & Rose, C. (2008) Relative response of patients with myelodysplastic syndromes and other transfusion-dependent anaemias to deferasirox (ICL670): a 1-yr prospective study. *European Journal of Haematology*, 80, 168–176.
16. Taher, A., El-Beshlawy, A., Elalfy, M.S., Al Zir, K., Daar, S., Habr, D., Kriemler-Krahn, U., Hmissi, A. & Al Jefri, A. (2009) Efficacy and safety of deferasirox, an oral iron chelator, in heavily iron-overloaded patients with beta-thalassaemia: the ESCALATOR study. *European Journal of Haematology*
17. *Br J Haematol.* 2011 Jun;153(6):780-5. doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08590.x. Epub 2011 Apr 22. Quantitative computed tomography assessment of transfusional iron overload. Wood JC, Mo A, Gera A, Koh M, Coates T, Gilsanz V.

- 18.Papakonstantinou O, Alexopoulou E, Economopoulos N, Benekos O, Kattamis A, Kostaridou S, Ladis V, Efstathopoulos E, Gouliamos A, Kelekis NL. Assessment of iron distribution between liver, spleen, pancreas, bone marrow, and myocardium by means of R2 relaxometry with MRI in patients with beta-thalassemia major. *Eur Radiol.* 2011 Dec;21(12):2503-10.
- 19.Brewer CJ, Coates TD, Wood JC. Spleen R2 and R2\* in iron-overloaded patients with sickle cell disease and thalassemia major. *J Magn Reson Imaging.* 2009;29:357-64.
- 20.St Pierre, T.G., Clark, P.R., Chua-anusorn, W., Fleming, A.J., Jeffrey, G.P., Olynyk, J.K., Pootrakul, P., Robins, E. & Lindeman, R. (2005) Noninvasive measurement and imaging of liver iron concentrations using proton magnetic resonance. *Blood*, 105, 855–861.
- 21.Wood, J.C., Enriquez, C., Ghugre, N., Tyzka, J.M., Carson, S., Nelson, M.D. & Coates, T.D. (2005) MRI R2 and R2\* mapping accurately estimates hepatic iron concentration in transfusion-dependent thalassemia and sickle cell disease patients. *Blood*, 106, 1460–1465. y, 82, 458–465.
- 22.Alustiza J.M. Artetxe J., Castiella A et al., MR quantification of hepatic iron concentration, “*Radiology*”, 2004;230:479-484
- 23.Clark P.R.;St. Pierre T.G. Quantitative mapping of transverse relaxivity  $[(1/T(2))]$  in hepatic iron overload: A single spin-echo imaging methodology,”*Magn. Reson.Imaging*”, 2000; 18:413-438
- 24.Brittenham, G.M., Griffith, P.M., Nienhuis, A.W., McLaren, C.E., Young, N.S., Tucker, E.E., Allen, C.J., Farrell, D.E. & Harris, J.W. (1994) Efficacy of deferoxamine in preventing complications of iron overload in patients with thalassemia major. *New England Journal of Medicine*, 331, 567–573.
- 25.Angelucci, E., Brittenham, G.M., McLaren, C.E., Ripalti, M., Baronciani, D., Giardini, C., Galimberti, M., Polchi, P. & Lucarelli, G. (2000) Hepatic iron concentration and total body iron stores in thalassemia major. *New England Journal of Medicine*, 343, 327–331.

26. Gandon Y, Guyader D, Heautot JF, Reda MI, Yaouanq J, Buhé T, Brissot P, Carsin M, Deugnier Y. Hemochromatosis: diagnosis and quantification of liver iron with gradient-echo MR imaging. *Radiology*. 1994;193:533-8.
27. Cazzola M, Della Porta MG, Malcovati L. Clinical relevance of anemia and transfusion iron overload in myelodysplastic syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008:166-75.
28. Parker C, Omine M, Richards S, Nishimura J, Bessler M, Ware R, et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2005;106:3699-709.
29. Marchiafava E. Anemia emolitica cronica con emosiderinuria perpetua. *Il Policlinico, Sezione medica*. 1928;35:105-17.
30. Hartmann RC, Jenkins DE, Jr, McKee LC, Heyssel RM. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: clinical and laboratory studies relating to iron metabolism and therapy with androgen and iron. *Medicine (Baltimore)*. 1966; 45:331-363.
31. Rimola J, Martín J, Puig J, Darnell A, Massuet A. The kidney in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: MRI findings. *Br J Radiol*. 2004;77:953-6.
32. Noone T.C, Semelka R.C., Siegelman E.S. et al. Budd-Chiari syndrome: spectrum of appearances of acute, subacute and chronic disease with magnetic resonance imaging. *J Magn Reson Imaging* 2000;11:44-50
33. Hillmen P, Young NS, Schubert J, Brodsky RA, Socie G, Muus P, et al. The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 2006;355:1233-43.
34. Risitano AM, Perna F, Selleri C. Achievements and limitations of complement inhibition by eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: the role of complement component 3. *Mini Rev Med Chem*. 2011 Jun 1;11(6):528-35.

35. Antonio M Risitano, Massimo Imbriaco, Ludovica Marando, Elisa Seneca, Ernesto Soscia, Luca Malcovati, Anna Paola Iori, Fabrizio Pane, Rosario Notaro, Margherita Matarazzo.  
From perpetual hemosiderinuria to possible iron overload: iron homeostasis changes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients on eculizumab  
Br J Haematol 2012 Aug;158(3):415-8
36. Risitano AM, Notaro R, Marando L, Serio B, Ranaldi D, Seneca E, et al. Complement fraction 3 binding on erythrocytes as additional mechanism of disease in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients treated by eculizumab. Blood. 2009;113:4094-100.
37. Hill A, Rother RP, Arnold L, Kelly R, Cullen MJ, Richards SJ, Hillmen P. Eculizumab prevents intravascular hemolysis in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and unmasks low-level extravascular hemolysis occurring through C3 opsonization. Haematologica. 2010;95:567-73.
38. Luzzatto L, Risitano AM, Notaro R. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and eculizumab. Haematologica. 2010;95:523-6.
39. Mathieu D, Rahmouni A, Villeneuve P, Anglade MC, Rochant H, Vasile N. Impact of magnetic resonance imaging on the diagnosis of abdominal complications of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Blood. 1995;85:3283-8.
40. Roubidoux MA. MR of the kidneys, liver, and spleen in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Abdom Imaging. 1994;19:168-73.
41. Suzukawa K, Ninomiya H, Mitsuhashi S, Anno I, Nagasawa T, Abe T. Demonstration of the deposition of hemosiderin in the kidneys of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria by magnetic resonance imaging. Intern Med. 1993;32:686-90.
42. Schein A, Enriquez C, Coates TD, Wood JC. Magnetic resonance detection of kidney iron deposition in sickle cell disease: a marker of chronic hemolysis. J Magn Reson Imaging. 2008;28:698-704

43. Multi-center validation of the transferability of the magnetic resonance T2\* technique for the quantification of tissue iron. *Haematologica* 2006; 91:1388-1391  
Tanner MA, He T, Westwood MA, Firmin DN, Pennell DJ Thalassaemia International Federation Heart T2\* Investigators
44. International reproducibility of single breathhold T2\* MR for cardiac and liver iron assessment among five thalassaemia centers.  
Kirk P, He T, Anderson LJ, Roughton M, Tanner MA, Lam WW, Au WY, Chu WC, Chan G, Galanella R, Matta G, Fogel M, Cohen AR, Tan RS, Chen K, Ng I, Lai A, Fucharoen S, Laothamata J, Chuncharunee S, Jongjirasiri S, Firmin DN, Smith GC, Pennell DJ.  
*J Magn Reson Imaging*. 2010 Aug;32(2):315-9. doi: 10.1002/jmri.22245.